

# 定量蛋白质组学研究方法

PLAYDOUGH MAN  
★ IN THE SPOTLIGHT

周强伟



# 背景

- **蛋白质组学**：指一个基因或细胞或一个组织所表达的全部蛋白质
- **定量蛋白质组学**：通过某种方法技术对生物样品（细胞、组织等）在某些过程中蛋白质的含量进行比较。
- **主要任务**是解决不同蛋白质表达水平的变化情况

PLAYDOUGH MAN  
★ IN THE SPOTLIGHT



# 方法

## ➤ 双相聚丙烯酰胺凝胶电泳技术(2 - DE)

- ★ 常规双向电泳

- ★ DIGE-双向荧光差异凝胶电泳

## ➤ 同位素稀释技术

- ★ 提取前标记方法(代谢标记方法)

- $^{15}\text{N}$ 标记法

- SILAC

- ★ 提取后标记方法

- ICAT (蛋白质标记)

- iTRAQ (肽段标记)

- ★ 反转标记方法

PLAYDOUGH MAN  
★ IN THE SPOTLIGHT



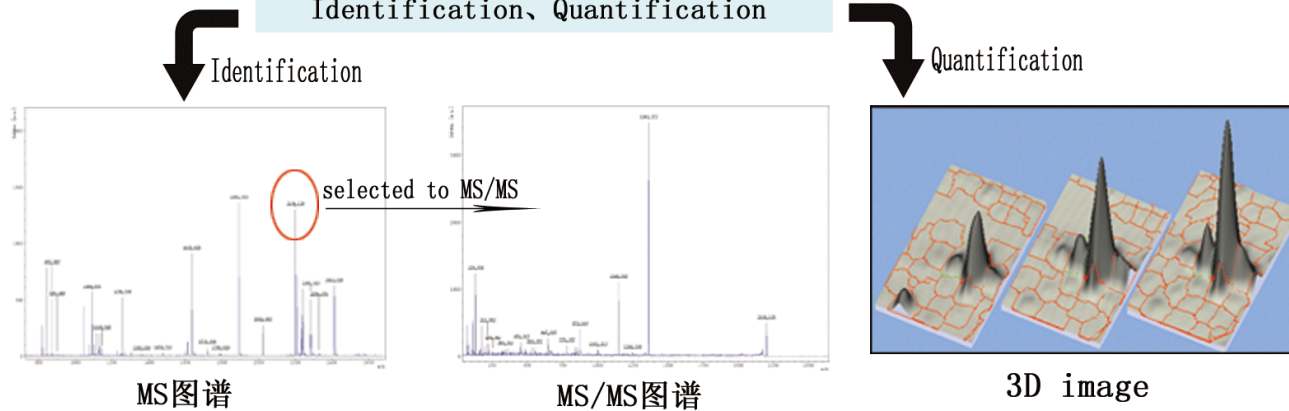
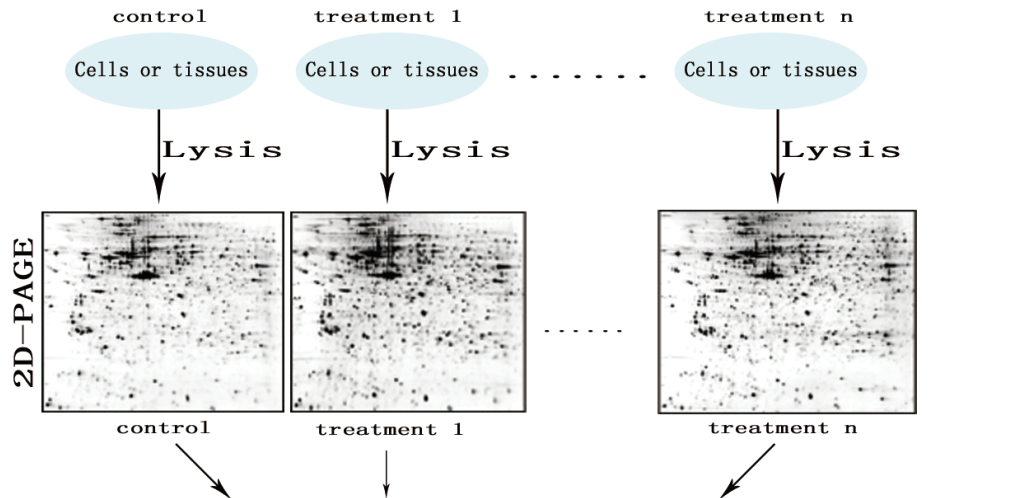
# 常规双向电泳

## 技术服务流程

样品准备

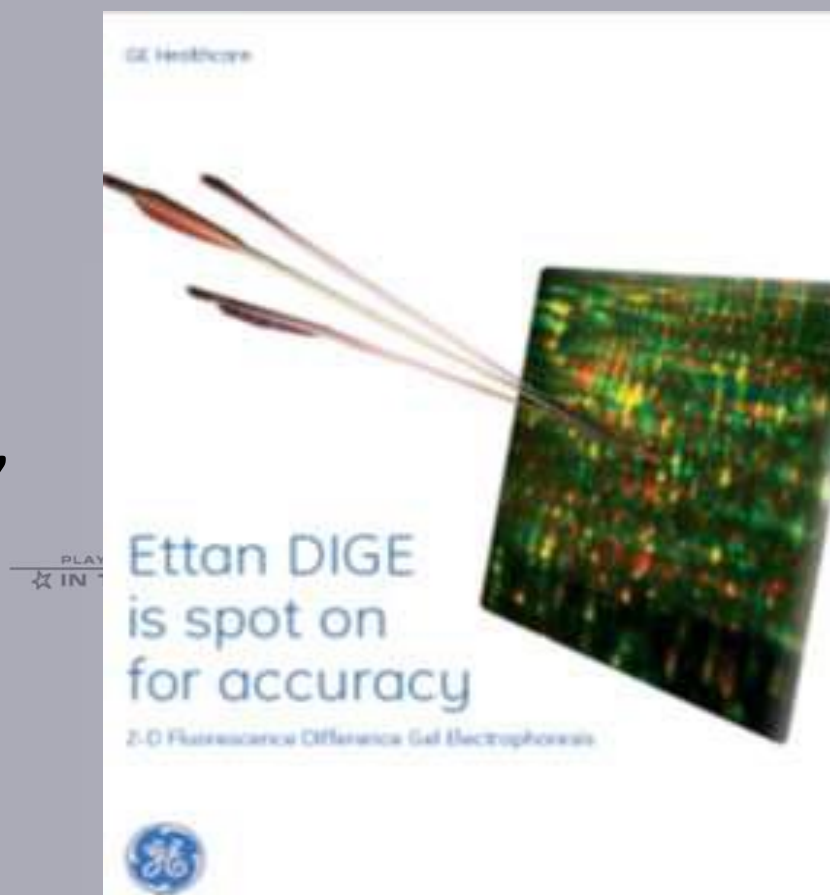
蛋白质分离

蛋白质定性、定量



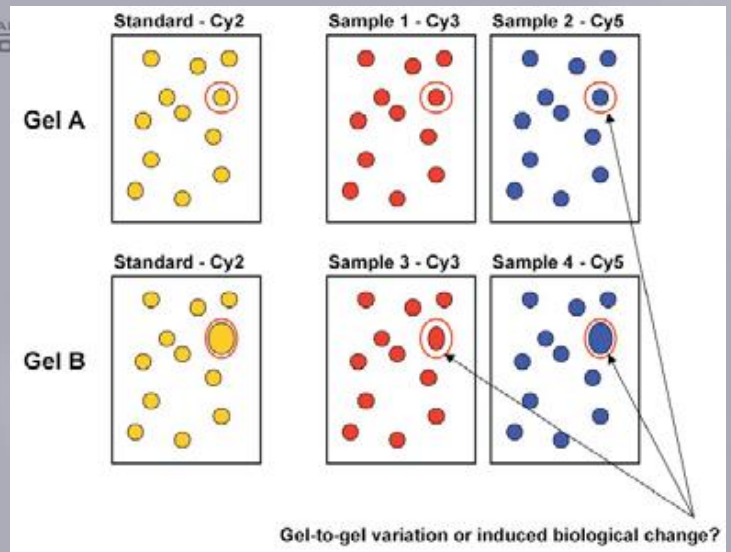
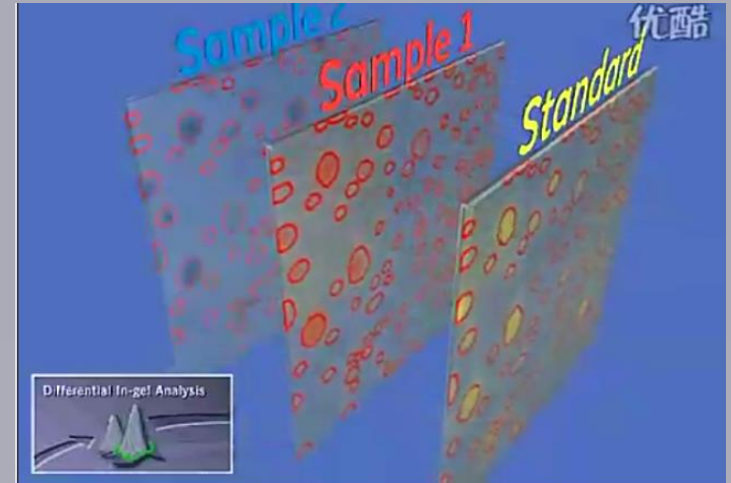
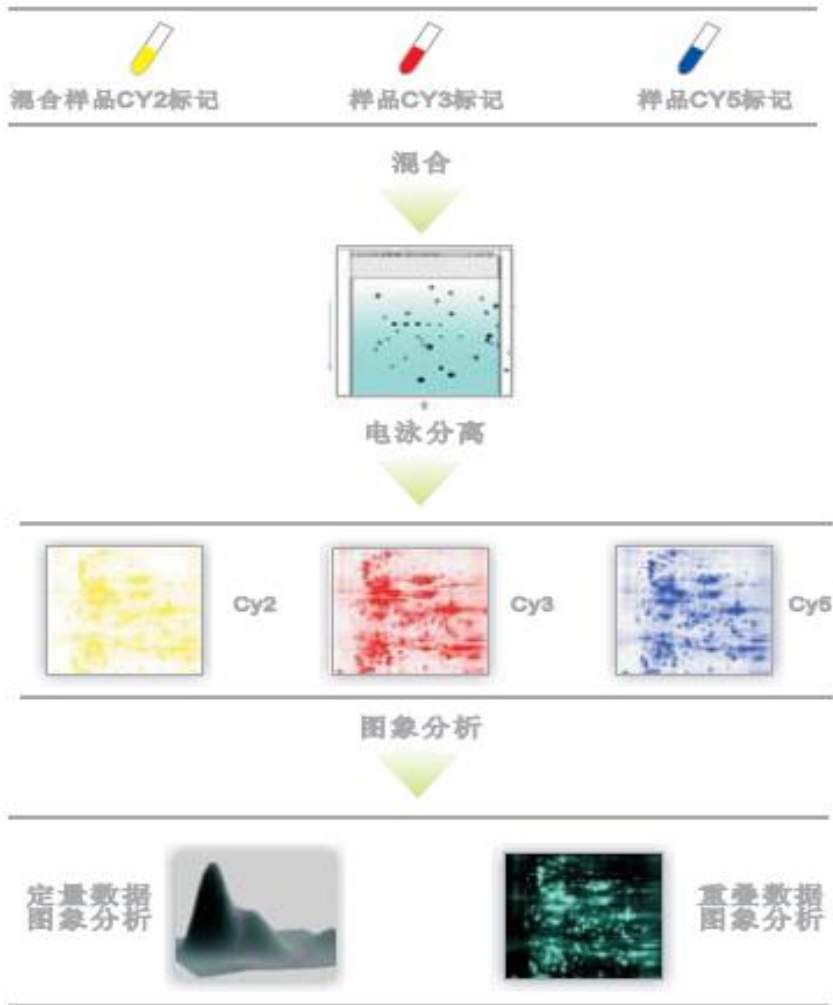
# 常规双向电泳面临的挑战

- 灵敏度
- 重复性
- 定量精确性
- 耗时长,劳动强度大,操作繁琐



# DIGE-双向荧光差异凝胶电泳

DIGE流程图



# DIGE-相对技术优势

- 精确（可信度>95%）
- 标准化（内标最大程度降低偏差）
- 重复性
- 高效（多蛋一胶）
- 简化（易用）
- 可靠

PLAYDOUGH MAN  
★ IN THE SPOTLIGHT



# 同位素稀释技术

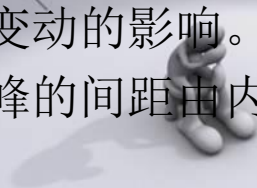
**同位素稀释技术** ( isotope dilution technique)它是在样品中加入包含稳定的重质同位素( $^2\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{18}\text{O}$ ) 试剂,与被分析物结合而使之被标记,通过质谱检测以确定其蛋白质的表达水平。

质谱分析过程中,肽的离子化效率随时间有一定的变动性,需采用内标法获得较为可靠的定量分析结果。**内标**通常是用富含某种重质同位素的试剂标记与被分析肽段相同的肽段作为其内标物,被分析肽段则与正常的同种试剂(元素的含量皆为天然丰度) 结合。

内标肽段与被分析肽段(分析对):

- ✓ 仅质量上相差几个单位
- ✓ 物理、化学性质几乎完全相同,克服了质谱离子化效率变动的影响。
- ✓ 质量数的差异使分析对最终在质谱图上表现为一对峰,峰的间距由内标物所含的重质同位素的个数所决定

PLAYDOUGH MAN  
★ IN THE SPOTLIGHT



# 同位素稀释技术

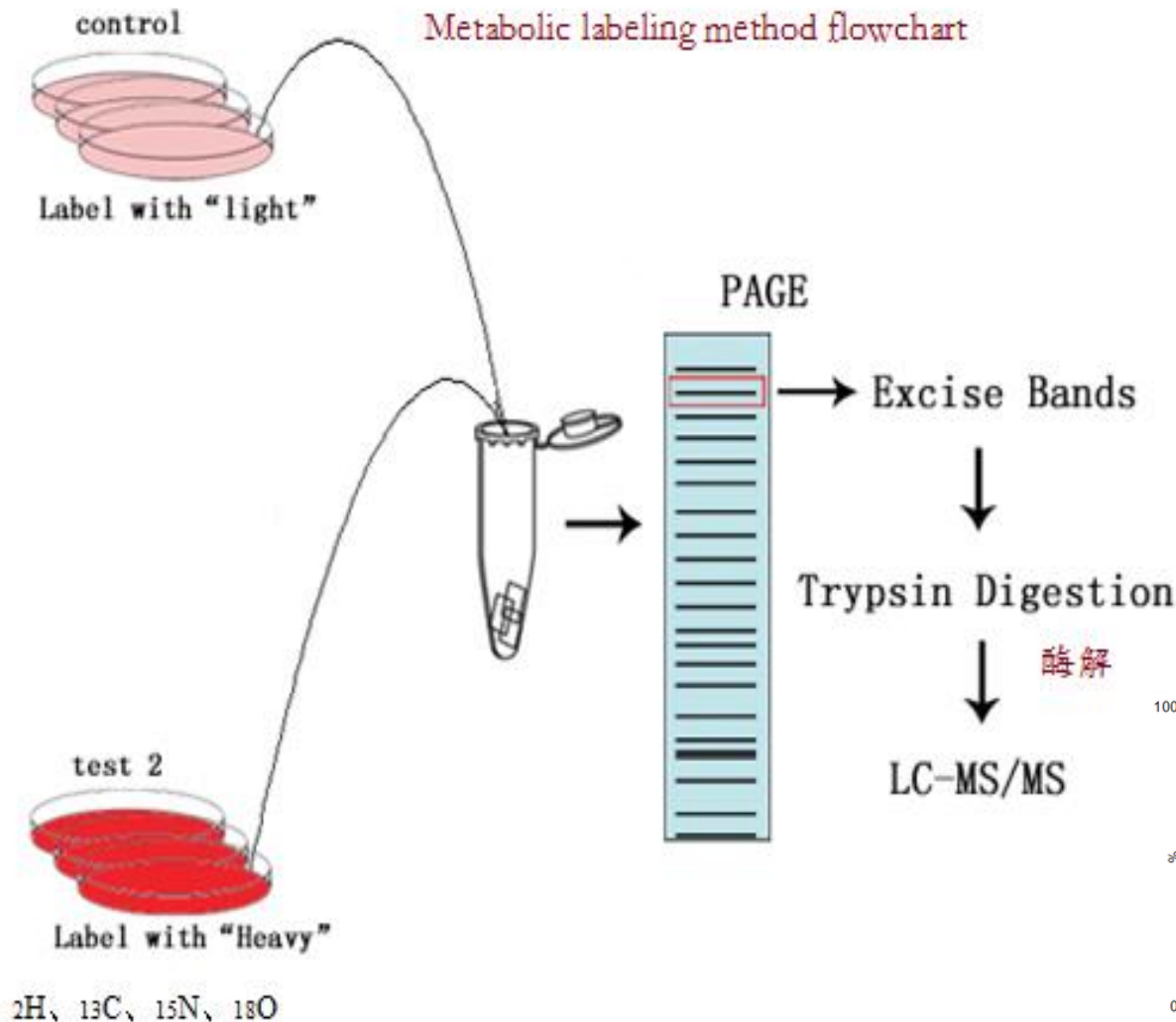
根据标记过程分为：

- 提取前标记方法(代谢标记方法)
- 提取后标记方法
- 反转标记方法

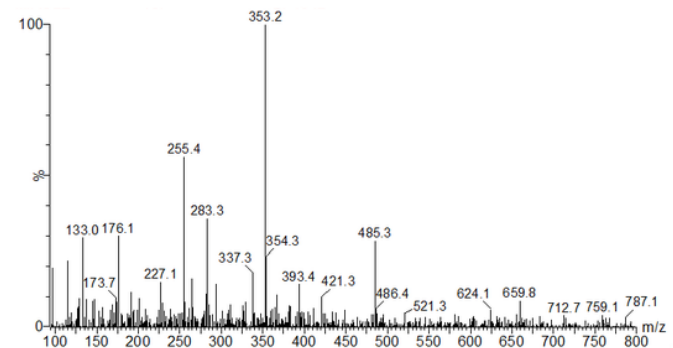
PLAYDOUGH MAN  
★ IN THE SPOTLIGHT



# 提取前标记方法(代谢标记方法)



- $^{15}\text{N}$ 标记法
- SILAC



Typical MS spectrum using metabolic isotope labeling method

# $^{15}\text{N}$ 标记法

## 优点:

- 高效性:  $^{15}\text{N}$ 标记法是体内标记技术, 标记效率可高达95%;
- 重现性: 降低由于样品制备不同而造成的实验内差异;
- 灵活性: 在培养基中添加同位素标记 $^{15}\text{N}$ , 操作方便。

## 缺点:

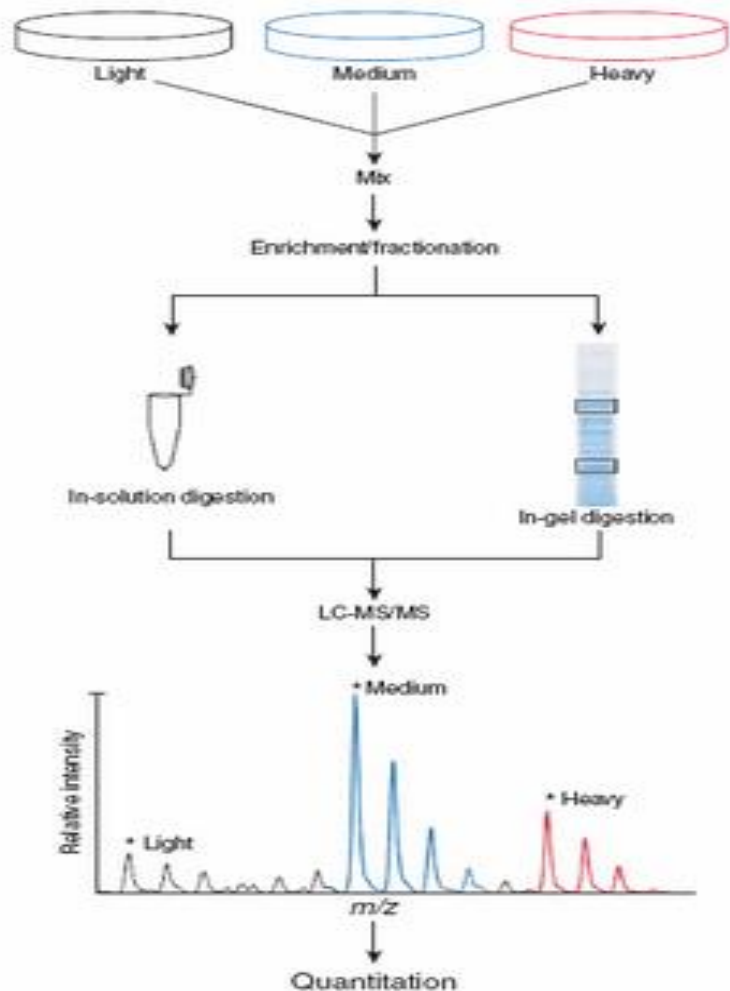
只有已知蛋白质的氨基酸序列, 才可以对 $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ 标记的蛋白质或肽段的相应质量位移进行预测。

富含同位素的介质可能会改变细胞生长中的某些过程, 从而人为地改变蛋白质组的表达水平, 即有时不能够真实地反映出细胞内蛋白质的表达情况。

同位素试剂需要量较大, 成本高



# SILAC: 细胞培养条件下稳定同位素标记技术



含有轻、中、重同位素型必需氨基酸的培养基进行细胞培养，用于SILAC主要的稳定同位素氨基酸是Lys和Arg

SILAC法。

1、标记：在缺乏Lys和Arg的培养基中添加Lys和Arg的同位素Lys(D4或 $^{13}\text{C}_6$   $^{15}\text{N}_4$ )、Arg( $^{13}\text{C}_6$ , 或 $^{13}\text{C}_6$   $^{15}\text{N}_4$ )等培养细胞，使蛋白质被标记成“中型”或“重型”；

2、细胞处理，如药物处理；

3、细胞裂解、提取蛋白质；

4、等量混合对照与处理组蛋白质、SDS-PAGE电泳、染色；

5、割取蛋白质条带，胰蛋白酶消化，质谱分析。

# SILAC

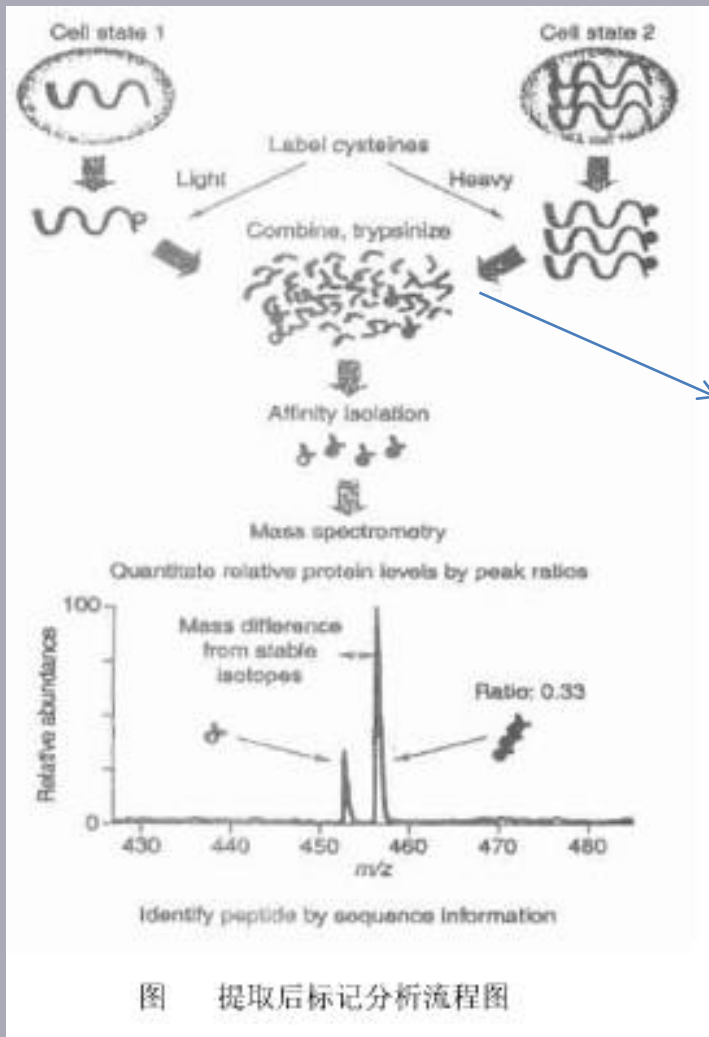
## 技术优势

- **高效性：** SILAC是体内标记技术，标记效率可高达100%；
- **定量精确：** 线性范围广，降低由于样品制备不同而造成的实验内差异；
- **高通量、灵敏度高：** 可同时鉴定并定量数百至数千种蛋白质，且检测可测到纳克级水平；
- **相容性：** 可以对多种在DMEM或RPMI 1640培养基中能够培养的细胞或细菌中表达的蛋白进行标记；
- **灵活性：** 在缺乏L-赖氨酸和L-精氨酸的培养基中添加同位素标记的这两种氨基酸，操作方便。

PLAYDOUGH MAN  
★ IN THE SPOTLIGHT



# 提取后标记方法



- 这种方法多用富含氘( $^2\text{H}$ ) 原子的试剂。通常不含氘原子的试剂表示为d0 ,含氘原子的试剂用dn 表示

主要有:

- ICAT (蛋白质标记)
- iTRAQ (肽段标记)

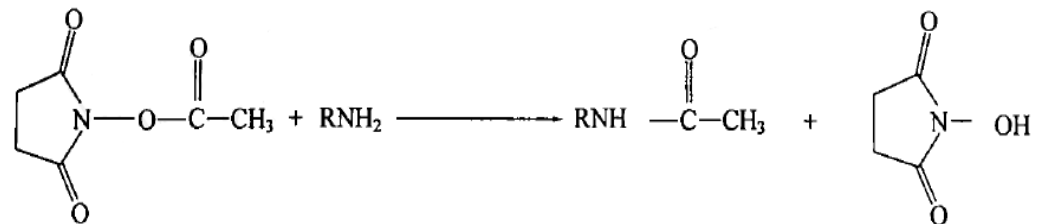
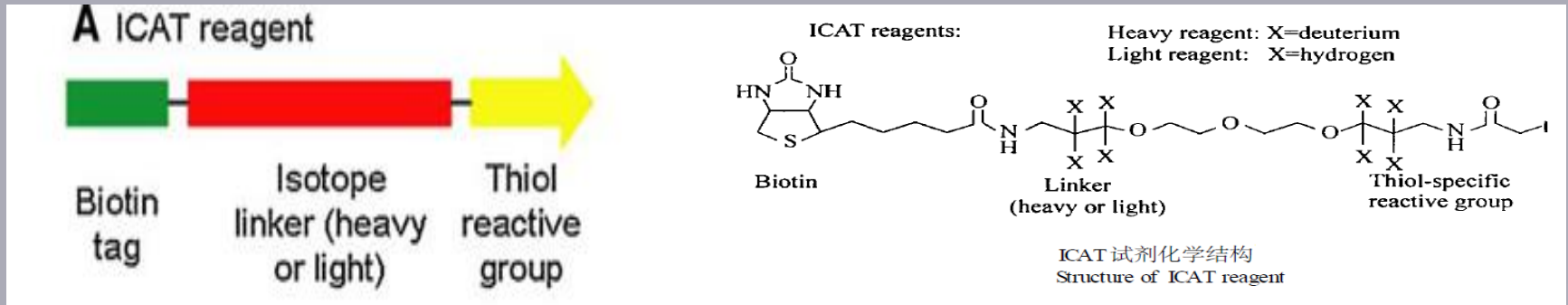


图 d<sub>0</sub>/d<sub>3</sub> 标记原理

Fig. Acylation of peptides with N - acetoxy succinimide



# ICAT



优点:

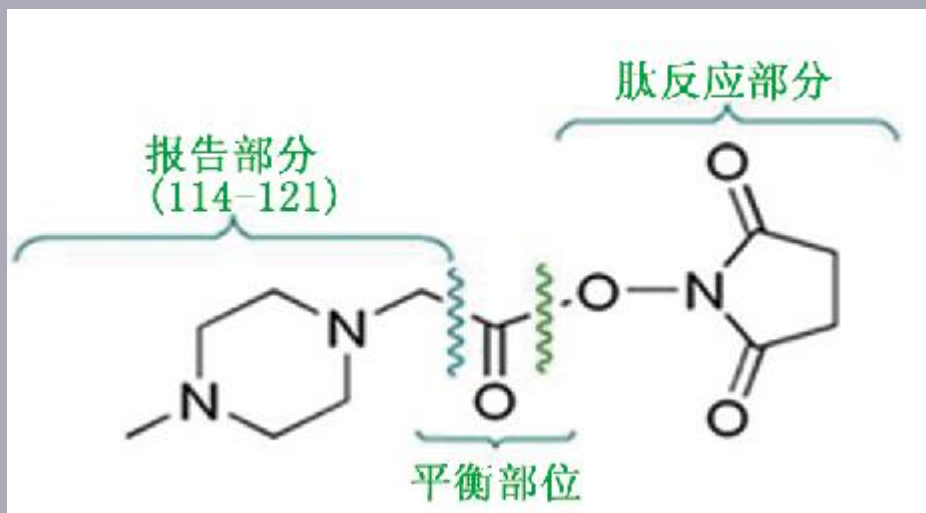
- ✓ ICAT 试剂由生物素部分、含重质同位素的连接部分以及半胱氨酸活性烷基化反应部分三部分组成,故该试剂还可以实现对含半胱氨酸的肽段进行选择分离,使分析过程简化而减少了过程误差。

PLAYDOUGH MAN  
★ IN THE SPOTLIGHT

缺点:

- ✓ 但是该方法由于ICAT 试剂的不易得到,且由于其含有较多的氘原子导致的分析物与内标物较大的色谱分离,而使其应用受到限制。
- ✓ ICAT分子量相对较大,与蛋白质连接后可能会造成分子的空间位阻

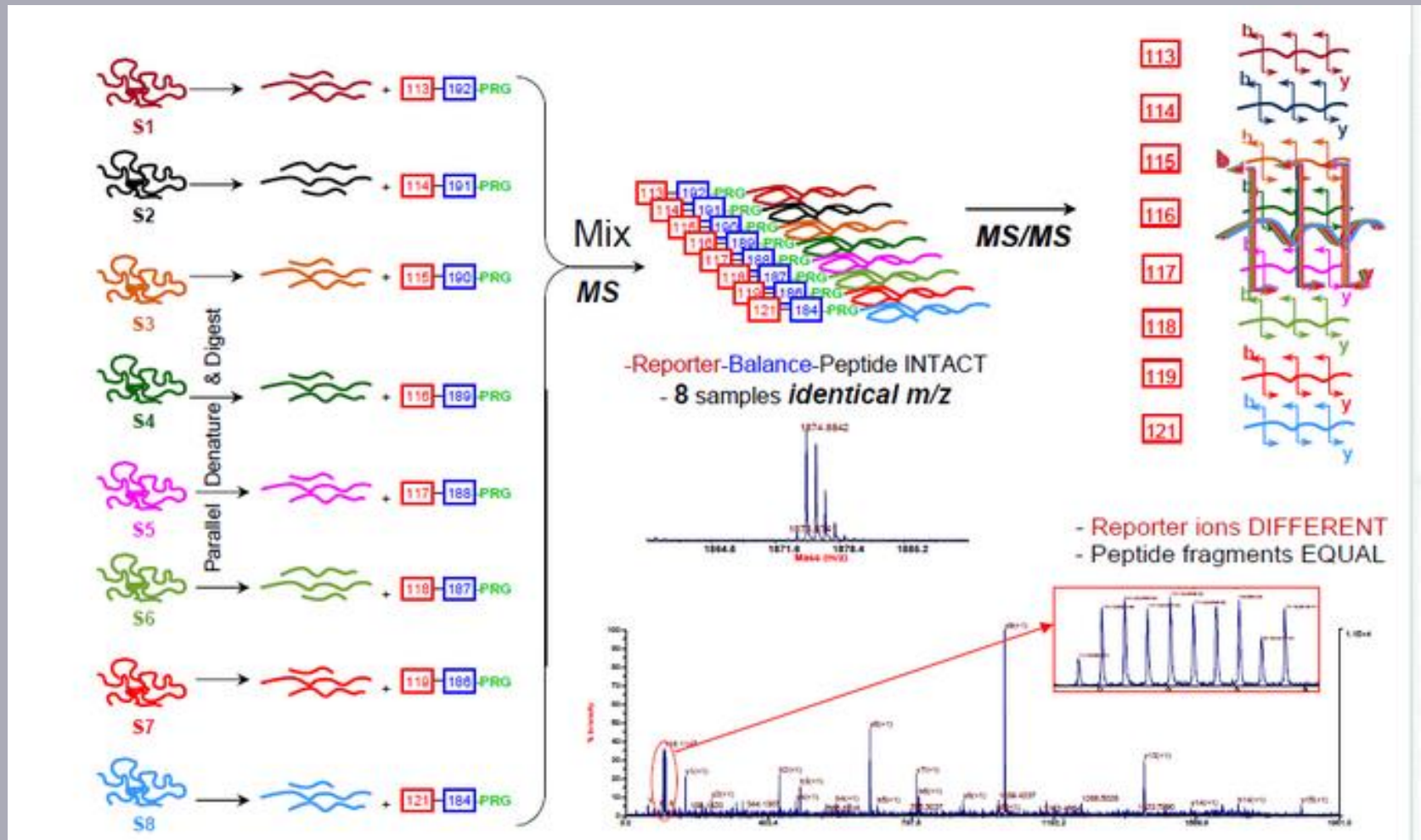
# iTRAQ:同位素相对标记与绝对定量技术



iTRAQ包括三部分：报告部分、肽反应部分、平衡部分。

- 1、报告部分有八种：114-121，因此iTRAQ可同时标记8组样品。
- 2、肽反应部分：能与肽N端及赖氨酸侧链发生共价连接而标记上肽段，几乎可以标记所有蛋白质。
- 3、平衡部分：保证iTRAQ标记的同一肽段的质荷比相同。

# iTRAQ



# iTRAQ

## 技术特点和优势

- 定量敏感、反应速度快
- 标记完全，标记效率高达97%以上
- 较高的重复性，能简化谱的复杂程度、提高离子强度
- 可对多达八种不同样本同时进行定量分析
- 定性与定量同时进行

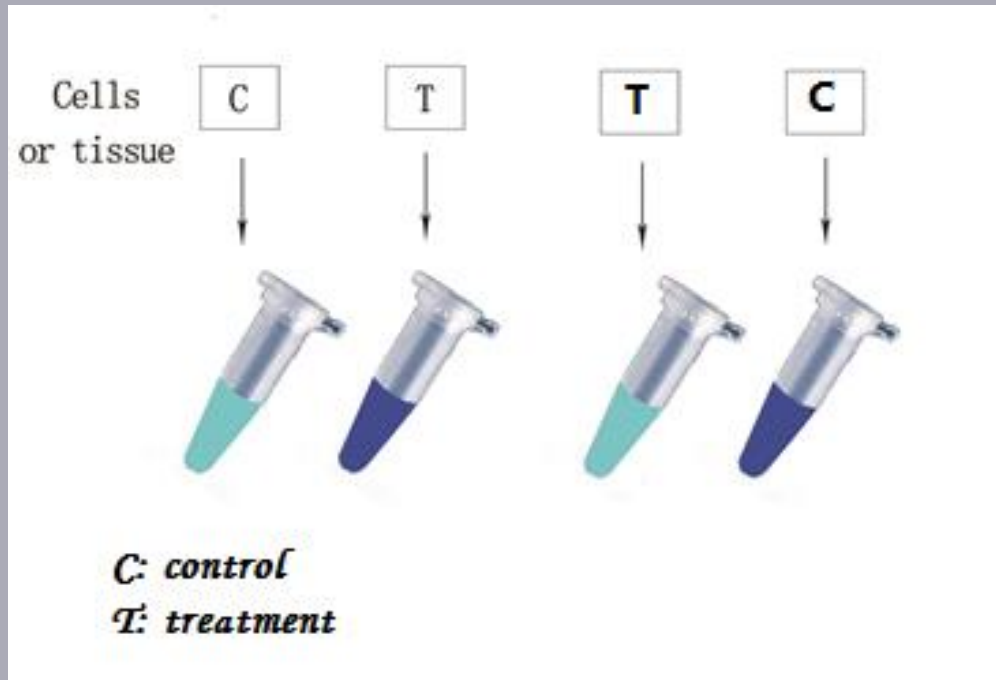
## 缺点：

- iTRAQ几乎可以标记所有的蛋白质，因此样本的污染对结果有影响。
- iTRAQ标记反应体系中有有机体积高达60%以上，蛋白质非常容易发生沉淀而损失。

PLAYDOUGH MAN  
★ IN THE SPOTLIGHT



# 反转标记方法



这种研究思路最大的长处是大大增加了对不同样本中差异蛋白识别的确定性,加快了分析速度,且该方法对体系复杂程度的耐受性也大大增加。

# 定量蛋白质组学应用

开始从整体上来重新研究生命系统，尽管仍无法有效地在不同分子之间建立功能上的联系，但是依靠蛋白质组学，我们就可以试图阐明某一特定组分的功能，而定量分析则是一个行之有效的方法

从蛋白质组水平上对基因表达进行准确的定量分析,是比较蛋白质组学的重要内容,是研究重大疾病致病机制以及药理控制机制的必要手段。

定量蛋白质组学已经被应用于疾病标志物筛选、疾病形成机制等健康问题方面的研究。

PLAYDOUGH MAN  
★ IN THE SPOTLIGHT



# ***THANKS!***

PLAYDOUGH MAN  
★ IN THE SPOTLIGHT

